

**Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる IL-4 の炎症抑制反応阻害と
転写因子の関係性**

IL-4 cannot inhibit IL-6 and IL-8 expression enhanced by IL-1 β , which caused by the different phosphorylation patterns of transcription factors in gingival fibroblasts derived from Down syndrome

日本大学大学院 松戸歯学研究科 歯学専攻

根岸 浩二

(指導：野本 たかと 教授)

Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる IL-4 の炎症抑制反応阻害と転写因子の関係性
IL-4 cannot inhibit IL-6 and IL-8 expression enhanced by IL-1 β , which caused by the different phosphorylation patterns of transcription factors in gingival fibroblasts derived from Down syndrome

根岸浩二¹⁾ 田中陽子²⁾

1) 日本大学大学院松戸歯学研究科

2) 日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

日本障害者歯科学会雑誌第 42 巻第 1 号 (2021 年 2 月末発行予定)

Key word : Down syndrome, Periodontitis, IL-4, NF- κ B, STAT3, STAT6

Corresponding : 田中 陽子

日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

Tel & Fax : 047-360-9443

E-mail ; tanaka.yoko@nihon-u.ac.jp

和文要旨：

Down 症候群 (DS) の歯周病は早期発症で急速に進行しやすいことが知られ、その原因に免疫応答異常が挙げられる。免疫応答の中心である T 細胞の分化を担う Interleukin (IL) -4 には抗炎症作用があり、炎症の収束で重要な働きをする。現在までに、DS の歯周病に関して炎症抑制因子に着目した報告はない。そこで、我々は DS にみられる炎症応答への IL-4 の関与を検証した。

健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) と Down 症候群由来歯肉線維芽細胞 (DGF) にリコンビナントタンパク rIL-1 α および rIL-4 を添加し、細胞応答を確認した。ELISA 法にてタンパク産生量を測定し、real-time PCR 法によって遺伝子発現量を確認した。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase を用いた。さらに、Western blotting 法にて、転写因子である nuclear factor (NF)- κ B p65, signal transducer and activator of transcription (STAT) 6 および 3 のリン酸化を確認した。内部標準として β -actin を用いた。

NGF では rIL-1 α /IL-4 群で rIL-1 α 群より IL-6 と IL-8 の発現は減少したが DGF では増大した。転写因子のリン酸化反応は NF- κ B p65 と STAT6 では DGF の方が低く、STAT3 では DGF の方が高かった。以上の事から DGF では IL-1 α で発現誘導された IL-6 および IL-8 に対する IL-4 による抑制効果は認められず、NGF とは異なる STAT6 および STAT3 のリン酸化反応が関与していることが考えられた。

英文抄録：

Periodontal disease in individuals with Down syndrome (DS) develops early-onset with rapidly and extensively progressive. The mechanisms have not been understood. Previous studies indicated that interleukin (IL)-4 suppressed IL-1 β -induced chemokines and matrix metalloproteinase in gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. We studied the cellular response in gingival fibroblasts derived from individuals with non-DS (NGF) and fibroblasts derived from individuals with DS (DGF) stimulated with recombinant IL-1 β (rIL-1 β) and recombinant IL-4 (rIL-4) to ensure the anti-inflammatory effect of IL-4 to DGF. The experimental groups were four, control, rIL-1 β additive group, rIL-4 additive group and the group that added rIL-1 β and rIL-4 simultaneously (rIL-1 β /IL-4). We measured the productions of IL-6 and IL-8 in supernatants using ELISA and analyzed those mRNA expressions using real-time PCR. In addition, phosphorylation of NF- κ B p65, STAT6, which are known as transcription factors, were detected by Western blotting. The protein productions and mRNA expressions of IL-6 and IL-8 in DGF with rIL-1 β were significantly higher than those in NGF. However, phosphorylation of NF- κ B p65 was weak in DGF with rIL-1 β . The IL-6 and IL-8 productions and mRNA expressions were significantly lower in NGF with rIL-1 β /IL-4 compared to that with rIL-1 β . On the other hand, those in DGF with rIL-1 β /IL-4 were significantly higher than those in DGF with rIL-1 β . The phosphorylation of STAT6 was weak in DGF compared to NGF. It is considered the enhancement of IL-6 and IL-8 expressions in DGF with rIL-1 β were via not only NF- κ B but also other signal pathways and factors. In addition, it is also considered that the weakness of phosphorylation of STAT6 induced the enhancement of IL-6 and IL-8 in DGF with rIL-1 β /rIL-4. It seemed that IL-4 plays as an anti-inflammatory factor in NGF but not in DGF.

緒 言

Down 症候群 (DS) は遺伝的背景によって、様々な機能異常および形態異常が表出する¹⁾。全身的には易感染性であり自己免疫疾患などの発症率が高く²⁾、口腔領域では健常者に比べて早期に発症し進行も早い重篤な歯周病の罹患率が高いことが報告されている³⁾。DS の平均寿命が 50 歳を超えた今、歯の早期脱落は長期間にわたる生活の質の低下だけでなく、オーラルフレイルによる全身機能低下にも深く関与することが推察される。従って、DS における重篤な歯周病の原因究明は急務である。DS に認められる T 細胞や B 細胞などのリンパ球、好中球、単球、免疫グロブリンの形態異常および機能異常に起因する免疫応答異常や活性酸素種の過剰産生などが、その特徴的な歯周病の原因の一端と考えられている^{5,6)}。我々も現在までに、DS 由来歯肉線維芽細胞 (DGF) と健常者由来歯肉線維芽細胞 (NGF) を歯周病原細菌の外膜構成成分である lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、DGF における炎症関連物質が NGF に比べて増大する結果を報告しているが⁷⁻⁹⁾、未だ全容解明には至っていない。慢性炎症は炎症期が完結されないことが原因となっていることも指摘されていることから^{10, 11)}、DS においては炎症の収束が適切に行われていないのではないかと考え、本研究では炎症の促進ではなく抑制に着目することとした。歯周病にみられる歯槽骨の吸収は、歯周病原菌やその構成成分である LPS、菌体外酵素などによって局所的に産生される interleukin (IL)-1 β や tumor necrosis factor α (TNF- α)、IL-6 などの炎症性サイトカインが、他の炎症関連物質の産生を誘導することで複雑なサイトカインネットワークを形成し、破骨細胞の分化と活性化を促進することによる結果である¹²⁾。このように IL-1 β は歯周病の炎症応答において重要な役割を示すが、近年 IL-1 β 刺激を受けたヒト歯肉線維芽細胞 (hGF) において、上昇した matrix metalloproteinase (MMP)3 が IL-4 によって抑制されるとの報告がなされた¹³⁾。MMP の過剰産生は歯周組織を構成する細胞外マトリックスの分解を促進させることから、IL-4 によって MMP3 が抑制されたことは、歯周病による組織破壊の制御に深く関与することを示唆している。IL-4 は多面発現性の免疫調整因子で主に T helper (Th) 2 細胞あるいは肥満細胞などから産生されるサイトカインであり、リンパ球の走化性に関与することが知られているが¹⁴⁾、hGF からも産生され、破骨細胞の生成を減少させるとの報告もある¹⁵⁾。また、歯周組織の局所的な IL-4 の欠如は組織破壊を誘発させると言われている¹⁶⁾。さらに、IL-4 は IL-1 によって誘導される炎症関連因子である prostaglandin E2 (PGE2) の産生量を抑制するとの報告もあり¹⁷⁾、抗炎症作用としての働きが注目され、近年では創薬のターゲットにもなっている。以上のことから我々は hGF においても IL-4 は、サイトカインネットワークの形成に深く関与する IL-1 β によって発現誘導された炎症メディエーターも抑制するのではないかと考えた。さらに、IL-1 β によるシグナル伝達が IL-4 によって制御されれば、DS にみられる重篤な歯周病を改善できるのではないかと考えた。歯周病における骨吸収に深く関与することが知られ多様な作用をもつ IL-6 および好中球の走化性に関与する IL-8 を炎症の指標とし、それらが DGF において IL-4 によって抑制されるのかを検証し、さらに、IL-1 β と IL-4 のそれぞれのシグナル伝達を担う転写因子のリン酸化を確認した。IL-1 β のシグナル伝

達において重要な役割を担う転写因子は nuclear factor (NF)- κ B p65 であり¹⁸⁾, IL-4 のシグナル伝達において重要な役割を担う転写因子は signal transducer and activator of transcription (STAT)6 および STAT3 であることが知られている¹⁹⁾。また B 細胞において, IL-4 が STAT6 を介して NF- κ B の発現調節にも関与するとの報告²⁰⁾や STAT6 と NF- κ B の遺伝子配列に共通する配列が存在することから相互に影響を及ぼし合うとの報告もある^{21, 22)}。以上のことから我々は免疫応答異常を認める DS 由来の DGF においては IL-1 β 添加による DGF の IL-6 および IL-8 の発現誘導は NGF よりも強く, それが NF- κ B p65 のリン酸化を介するものであり, さらに IL-4 添加により, STAT6 および SATA3 を介して IL-6 および IL-8 の発現誘導が抑制されると想定した。

材料および方法

1. 細胞培養

十分なインフォームドコンセントを行い, 同意を得た DS (n=4, 年齢幅: 8-12 歳) および健常者 (n=4, 年齢幅: 16-18 歳) から, 歯の交換期による抜歯時ないし, 歯科矯正による便宜抜歯時に辺縁歯肉を採取し, 歯肉線維芽細胞を分離培養した。培養は 10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: 以下 FBS) および抗菌薬 (50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin: GIBCO, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, USA; 以下 D-MEM) でを行い, 培養条件は 37°C, air 95%, CO₂ 5%の条件下であった。実験には 5~6 継代したものをを用いた。

2. タンパク産生量の測定

NGF および DGF を 60 mm 培養 dish に 4×10^5 細胞/dish になるよう播種し, 18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない新鮮な D-MEM に培地交換し 10 ng/ml のリコンビナント IL-1 β (rIL-1 β) (R&D systems, USA) および 10 ng/ml のリコンビナント IL-4 (rIL-4) (PEPROTECH, USA) を添加した。rIL-1 β および rIL-4 の添加濃度は過去の論文を参考に決定した¹²⁾。rIL-1 β と rIL-4 の同時添加群 (以下 rIL-1 β /IL-4 群) の他に, それぞれのリコンビナントの影響を確認するため, rIL-4 単独添加群 (以下 rIL-4 群), rIL-1 β 単独添加群 (以下 rIL-1 β 群) を設けた。また, コントロール群は, rIL-1 β , rIL-4 を無添加とし同量の H₂O を添加した。

添加後 6 および 24 時間培養した後, 培養上清を回収し ELISA 法にて IL-6 および IL-8 の培養上清中のタンパク量を測定した。ELISA 法はそれぞれ Human IL-6 ないし Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, USA) を用いて行った。

結果の表示は, 事前に NGF および DGF とともに n ごとにデータを集計し, 逸脱した値を示した n がいないことを確認したうえで, NGF および DGF とともに各群 n=1 に対して 3 well ずつとし, n=4 すべてのデータを統合した 12 サンプルから標準偏差を求めて示した。

3. 遺伝子発現解析

リコンビナントタンパクの添加までの実験過程をタンパク産生量の測定と同様に行い、添加後 6 時間で細胞を回収した。回収した細胞から total RNA を RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Germany)にて抽出した。抽出した total RNA から QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, Germany) を用いて cDNA を合成した。これらの cDNA を鋳型とし、KAPA SYBR FAST qPCR Kit® (Kapa Biosystems, USA) と IL-6, IL-8 およびハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のプライマー (表 1) を用いて real-time PCR 法 (Eco™ Real Time PCR system ; illumina, USA) にて遺伝子発現解析を行った。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH を内部標準として用いた。ターゲット遺伝子発現量を GAPDH に対する比率で表した。実験群はタンパク産生量の測定と同様 4 群である。結果の表示はタンパク産生量と同様に行った。

4. 転写因子のリン酸化解析

NGF (n=4) および DGF (n=4) を 6 well 培養プレートに 2×10^5 細胞/well になるよう播種した。播種は n=1 あたり 1 well ずつとした。18 時間培養後、FBS および抗菌薬を含まない新鮮な D-MEM に交換し、10 ng/ml の rIL-1 β および 10 ng/ml の rIL-4 を添加した。添加後、15, 30 分で、培養上清を完全に除去した細胞からタンパクを抽出した。抽出には、Protease Inhibitor Cocktail® (Thermo Fisher Scientific, USA) および Phosphatase Inhibitor Cocktail Solution® (Wako, Japan) を含む RIPA buffer® (Wako, Japan) を用いた。Bradford 法にて定量し、タンパク量を合わせて Western blotting 法によってタンパク発現解析を行った。Western blotting 法は、10% SDS-polyacrylamide gel (Wako, Japan) を用いて電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレン (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて転写を行った。メンブレンに転写されたタンパクに任意の各種一次抗体を反応させた後、酵素で標識された二次抗体を反応させて発色しリン酸化されたタンパクの検出を行った。一次抗体として、phospho- NF- κ B p65 ラビットモノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, USA) , phospho- signal transducer and activator of transcription 6 (phospho-STAT6) ラビットポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, USA), phospho- signal transducer and activator of transcription 3 (phospho-STAT3) ラビットモノクローナル抗体および β -actin マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, USA) を用いた。全ての一次抗体を 1 : 500 で各々のメンブレンと 1 時間反応させた。二次抗体として、HRP 標識抗体である抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare, USA) および抗ラビット IgG 抗体 (Sigma-Aldrich, USA) を使用した。全ての二次抗体は 1:5000 にて各々のメンブレンと 45 分間室温で反応させ、Chemi-Lumi One Super (Nacalai tesque, Japan) と ChemiDoc™ Touch MP system (Bio-Rad, USA) を使用し、特異的バンドの検出を行った。全ての試料に対し細胞播種からバンド検出までの全ての行程を 3 回繰り返し行った。その

後、得られたバンド画像を Image J で処理し、バンドの輝度を数値化した。Phospho- NF- κ B p65, phospho-STAT6 および phospho-STAT3 の輝度値を内部標準である β -actin の輝度値で標準化し、相対シグナル強度とした。

6. 統計処理

SPSS Version 26.0 (IBM, USA) を用いて、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer test を用い有意水準 5% で統計処理を行った。

なお、本研究は日本大学研究倫理委員会の承認を得て行ったものである（倫理審査承認番号；EC16-15-011-1）。

結 果

1. タンパク産生量への影響

NGF では rIL-1 β 群に比べて rIL-1 β /IL-4 群の IL-6 産生量は 6 時間、24 時間ともに有意に減少したが、DGF では有意差を認めなかった。また、NGF, DGF ともにコントロール群に比べて、rIL-4 群, rIL-1 β 群, rIL-1 β /IL-4 群の IL-6 産生量は 6, 24 時間で有意に高かった。6 時間のコントロール群, rIL-4 群は NGF と DGF に有意差を認めなかったが、それ以外では、6 時間、24 時間ともにそれぞれの実験群で、DGF の方が NGF よりも有意に高かった（図 1A）。

NGF における rIL-1 β /IL-4 群の IL-8 産生量は、6 時間、24 時間ともに、rIL-1 β 群に比べて有意に減少した。一方、DGF においては rIL-1 β /IL-4 群の方が IL-1 β 群よりも 6 時間、24 時間ともに有意に増加した。そして、NGF, DGF ともにコントロール群に比べて、rIL-1 β 群, rIL-1 β /IL-4 群の IL-8 産生量は有意に増加したが、rIL-4 群では、DGF の 24 時間以外はコントロール群と有意差を認めなかった。また、全ての時間において、rIL-1 β 群および rIL-1 β /IL-4 群の IL-8 産生量は NGF に比べて DGF の方が有意に高かった（図 1B）。

2. 遺伝子発現への影響

IL-6, IL-8 の遺伝子発現において、NGF では rIL-1 β 群に比べて rIL-1 β /IL-4 群の方がともに有意に低下したが、DGF では有意に上昇した。また、rIL-4 群は、NGF, DGF ともにコントロール群と有意差を認めず、rIL-1 β 群, rIL-1 β /IL-4 群はコントロール群に比べて有意に上昇した。rIL-1 β 群, rIL-1 β /IL-4 群における IL-6 および IL-8 遺伝子発現は DGF の方が NGF よりも有意に高かった（図 2 A, B）。

3. 転写因子のリン酸化への影響

転写因子である NF- κ B p65, STAT6 および STAT3 のリン酸化について、それぞれ phospho-

NF- κ B p65, phospho-STAT6 および phospho-STAT3 を Western blotting 法にて検出することで確認した。

NGF における phospho-NF- κ B p65 は, 15 分, 30 分とも全ての群で検出され, rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群で相対シグナル強度は高かった。また, rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群間に有意差は認められず, それぞれの群内での時間による有意差も認めなかった。一方, DGF における phospho-NF- κ B p65 は, 15 分ではコントロール群と rIL-4 群で相対シグナル強度は低く, rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群で高かった。30 分では全ての群で検出されたが, いずれも相対シグナル強度は低く群間における有意差は認めなかった。rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群は 15 分よりも 30 分の方が有意に低かった。また NGF との比較では DGF の方が低かった。

NGF における phospho-STAT6 は 15, 30 分ともに rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群で検出され両群間に有意差は認めず, さらに時間による有意差も認めなかった。一方 DGF における phospho-STAT6 は 15 分, 30 分で rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群で検出されたが, 30 分の方がいずれの群も相対シグナル強度は有意に低かった。また NGF との比較では DGF の方が低かった。

NGF の phospho-STAT3 は 15 分では全ての群に検出され, rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群の相対シグナル強度はコントロール群とに有意差を認めるものの, DGF と比べて有意に低かった。30 分の rIL-4 群および rIL-1 β /IL-4 群の相対シグナル強度は高かった。一方 DGF においては, 15 分, 30 分ともに全ての群に検出が認められたが, 15 分では rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群において高く, rIL-4 群の方が有意に高かった。30 分では, rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群の間に有意差はなく, さらに 15 分に比べて低かった。

考 察

IL-4 は, T 細胞の分化誘導の他, 免疫応答の調節, 成長因子の制御, アポトーシスの制御など多面発現性の因子である¹⁴⁾。現在までに IL-4 が IL-1 β , TNF- α , LPS などによって発現誘導された炎症メディエーターを抑制するとの報告は数多く存在する^{17, 20, 21)}。歯周病においても, IL-4 は PGE2 や Chemokine ligand 20 の産生量の抑制や^{17, 23)}、炎症抑制に働く IL-10 の発現誘導に関与するなど²⁴⁾、抗炎症作用としての働きが報告されている。そのため, IL-4 は歯周病の改善に効果があるとされる²⁵⁾。しかしながら, hGF における炎症期の検証の報告はなく, さらに DS における歯周病に対して炎症抑制系に着目した報告もない。以上のことから, hGF においても IL-1 β によって発現誘導された IL-6 や IL-8 が IL-4 によって抑制されるのか, また DGF においても同様の効果が得られるのかについて検証した。rIL-1 β 添加では我々の想定通りに NGF よりも DGF の方が IL-6 および IL-8 のタンパク産生量および遺伝子発現は高かった。しかしながら, rIL-1 β 群での phospho-NF- κ B p65 の検出は NGF より DGF の方が低かった。炎症ではサイトカインやケモカイン, 接着分子が産生されるが, NF- κ B はこれらの遺伝子発現誘導に関与する転写因子であり, 通常は不活性な状態で細胞質に存在し, シグナルを受容するとリン酸化されて活性化し, 核に移行することで炎症応答を惹起する¹⁸⁾。明らかにされているいくつかの経路のなかでも IL-1 β のシグナル伝達には NF- κ B p65

が深く関与していると言われている^{26,27)}。しかしながら今回、rIL-1 β によって発現誘導された炎症性サイトカインの IL-6、ケモカインの IL-8 は、NGF よりも DGF の方が有意に高かったにもかかわらず、NF- κ B p65 のリン酸化反応は DGF の方が低かった。これは、DGF においては炎症メディエーターの発現誘導が NF- κ B p65 だけでなく mitogen-activated protein kinases (MAPK)^{28,29)} や extracellular signal-related kinase (ERK)/ c-Jun N-terminal kinase (JNK)^{30,31)}などの他の経路も深く関与している可能性も考えられる。また、最近、炎症誘導として IL-6 アンブという IL-6 の増幅回路の存在が明らかにされた³²⁾。この増幅回路は線維芽細胞など非免疫細胞に存在し、NF- κ B 経路と STAT3 経路の同時活性によって局所的に炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を持続的に産生する経路で、慢性炎症や自己免疫疾患で認められる³²⁻³⁴⁾。今回、rIL-4 群の DGF において特に 24 時間の IL-6 産生量が極めて高かったことや phospho-STAT3 の発現強度が早い時間に強く検出されたことから、DGF においてはこの IL-6 アンブがより強く引き起こされている可能性も考えられる。これらを明らかにするためには、NF- κ B だけではない経路についても時間的因子も含めて検討する必要がある。また、NF- κ B の活性にはその上流にある I kappa B kinase (IKK) 複合体が分解されるユビキチン化が必要であるが、興味深いことに、DS 由来の細胞株において通常の状態でもタンパクのユビキチン化機能が低下しているとの報告が Granese らによってなされた³⁵⁾。彼らの報告によると、DS のリンパ芽球や胎児線維芽細胞では IKK 複合体のユビキチン化が減弱していることに起因して NF- κ B p65 の発現が低くなるが、この現象は、21 番染色体上の Down's syndrome candidate region-1 (DSCR1) と Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) によって調節される免疫応答の重要な転写因子である nuclear factors of activated T cells (NF-ATs) の関与によるものであるとしている。具体的には、DSCR1 と DYRK1A の遺伝子発現が上昇するのに反して、本来上昇するはずの NF-ATs の発現量が減少したことからこの転写機能の低下が NF- κ B p65 活性の減弱につながっていると結論づけている。この報告から、今回、DGF において NGF よりも NF- κ Bp65 のリン酸化反応が弱かったのは同様に NF-ATs の活性低下が要因となる可能性があると思われた。

rIL-4 群では、DGF および NGF とともに IL-6 産生量がコントロール群に比べて高かったが、炎症は生体の防御反応であるため一時的に IL-6 が高くなることは正常な反応であり、IL-4 が IL-6 の発現を誘発するとの過去の報告と同様の結果であると言える³⁶⁾。一方 IL-4 による IL-8 の発現誘導は認められなかったが、過去に肥満細胞では IL-4 によって誘発されるとの報告³⁷⁾はあるものの刺激剤を添加した結果であり、多くは抑制に働く報告である³⁸⁾。以上のことから hGF においては IL-4 から直接的に IL-8 の発現は誘導されないと考えられた。

rIL-1 β /IL-4 群の NGF では rIL-1 β 群よりも IL-6 および IL-8 の発現が減少したことから IL-4 は炎症抑制効果を示すと思われたが、DGF では増大したことから、DGF に対しては抑制効果を示さない可能性があると考えられた。IL-4 による炎症効果について転写因子のリン酸化を確認した。phospho- NF- κ B p65 は、NGF、DGF とともに rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群で検出されたが、両細胞とも群間に有意差を認めなかった。従って、NF- κ B p65 は IL-4 の抗炎症

作用には関与していない可能性が考えられた。また、IL-4には2つの受容体が存在する。IL-4受容体 α 鎖IL-4R α と共通 γ 鎖よりなるtype I受容体と、IL-4R α とIL-13受容体 α 鎖IL-13R α 1よりなるtype II受容体である³⁹⁾。type II受容体は増殖抑制に関与し、type I受容体は細胞の走化性や増殖能など生存に関与する経路と免疫応答の調節に関与する経路が存在する³⁹⁾。どちらの受容体においても、必須とされているのが転写因子であるSTAT6のリン酸化である⁴⁰⁾。このSTAT6のリン酸化による活性化によって、IL-6などを抑制することが報告されている炎症抑制因子のIL-10の発現誘導がなされる⁴¹⁾。今回NGFおよびDGFで、IL-4添加によりphospho-STAT6がWestern blotting法で検出されたことから、両細胞ともにSTAT6活性化によるシグナル伝達は引き起こされたと考えられる。これは過去に歯根膜細胞を用いた実験で、IL-4によるSTAT6の関与で炎症メディエーターの抑制がなされたとする結果²³⁾と同様である。しかしながら、DGFはNGFに比べて低いうえ、NGFでは30分でも持続して高く検出されたのに対し、DGFでは極めて低い検出であった。DGFにおいてIL-4添加によりIL-6およびIL-8がNGFのように減少しなかった原因として、STAT6のリン酸化が弱く、持続性ではないことが考えられる。さらに、前述では本実験結果からNF- κ B p65はIL-4による炎症抑制に関与しない可能性を示唆したが、過去の報告では、IL-4がSTAT6を介してNF- κ Bの発現調節にも関与するとの報告やSTAT6とNF- κ Bの遺伝子配列に共通する配列が存在することから相互に影響を及ぼし合うとの報告もある^{21,22)}。NGFでは、STAT6およびNF- κ B p65ともにリン酸化が持続的に検出されており、相互に作用しあって炎症メディエーターの発現を調節している可能性が高い。一方DGFにおいてはSTAT6およびNF- κ B p65ともにリン酸化が弱く持続性もないことから相互に作用しあっても弱い応答であると考えられる。しかしながら、今回の実験ではrIL-1 β とrIL-4を同時に添加してIL-4による炎症抑制を検証したことから相互作用の検証には不十分であり、今後時間軸を加えた研究検証が必要であると思われた。また、IL-4のType IIレセプターにはSTAT6だけでなくSTAT3も関与する¹⁹⁾。今回の実験においてphospho-STAT3は、15分ではDGFの方がNGFよりも高く、30分では一転してDGFは極めて低くなり、NGFでは高かった。STAT3は、サイトカインシグナル伝達阻害因子(Suppressor of cytokine signalling) 3(SOCS3)を発現誘導することが知られている⁴²⁾。SOCS3はSTAT3-SOCS3の経路からIL-6のシグナル伝達を抑制する働きがあり、さらにSTAT3の時間的な活性量が抗炎症を規定し、長時間活性化したSTAT3はNF- κ Bを抑制する転写抑制因子として作用するとの報告がある^{42,43)}。今回の実験では、DGFのSTAT3のリン酸化が一過性であったことが示され、STAT3による抑制効果は得られなかったと考えられた。

血漿におけるIL-4の検出量を健常者とDSで比較した報告では両者間に有意差は認められなかったとしている⁴⁵⁾。今回、NGFではIL-4による炎症抑制を認め、その責任因子としてSTAT6およびSTAT3のリン酸化とその持続が考えられ、DGFではそれらの転写因子の弱く持続性のないリン酸化によって炎症抑制が認められなかったと考えられる。以上のことからDSの生体と考えた場合、IL-4については量的問題ではなく、機能的問題が存在している

可能性が高いと思われる。さらに、DGFの方がNGFに比べてIL-6およびIL-8のタンパク産生量や遺伝子発現が高いのにもかかわらず、NF-κB p65のリン酸化が弱いこと、またIL-4によってIL-6およびIL-8が増大したことについて、今後時間軸を含めた、NF-κB p65とSTAT6の関係性など、細胞内のクロストークを追求する必要があると思われる。

結 論

今回、IL-1βによって発現誘導されるIL-6およびIL-8に対しIL-4が抑制するかについてNGFおよびDGFにrIL-1βおよびrIL-4を添加することで検証した。rIL-1β群ではNGFよりもDGFの方がIL-6およびIL-8のタンパク産生量および遺伝子発現は上昇したが、NF-κB p65のリン酸化はNGFの方が高い結果であったことから、DGFにおいてはNF-κB以外の経路ないし要因が炎症増大に働いている可能性が示唆された。また、NGFではrIL-1β/IL-4群でrIL-1β群と比較して、IL-6およびIL-8のタンパク産生量ならびに遺伝子発現が低く、DGFでは高かったことから、NGFにおいてはIL-4による炎症抑制効果を認め、DGFでは認めないことが示唆された。rIL-1β/IL-4群でのNF-κB p65のリン酸化はNGF、DGFともにrIL-1β群と有意差を認めなかったことからIL-4による炎症抑制にNF-κB p65は関与しない可能性が考えられた。STAT6とSTAT3のリン酸化は、NGFでは持続していたがDGFでは一過性で持続性がなかったことから、DGFでは炎症抑制機構の異常があることが考えられた。

COI

本研究内容に関連し、開示すべきCOI関係にある企業はない。

参考文献

- 1) Hernandez D and Fisher EMC. Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder. *Human Molecular Genetics* 1996 ; 5 : 1411–1416.
- 2) Ram G and Chinen J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011 ; 164 : 9-16.
- 3) Cohen MM, Winer RA, Schwartz S, *et al.* Oral aspects of mongolism. Part I. Periodontal disease in mongolism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961 ; 14 : 92-107.
- 4) Benitez MT, Lopez PM, Yamamoto AN. Periodontal disease in adolescent Down' syndrome patients. Clinical case presentation. *Revista Odontológica Mexicana* 2014 ; 18 : 191-8.
- 5) Tanaka Y, Abiko Y, Mega J. The relationship between premature ageing and immune responses in the oral cavity of Down syndrome. *Japanese Dental Science Review* 2010 ; 46 : 78-85.
- 6) Komatsu T, Lee MC, Miyagi A, *et al.* Reactive oxygen species generation in gingival fibroblasts of Down syndrome patients detected by electron spin resonance spectroscopy. *Redox Report* 2007 ; 11 : 71-7.
- 7) Otsuka Y, Ito M, Ymaguchi M, *et al.* Enhancement of plasminogen activator activity stimulated by

- LPS in gingival fibroblasts of individuals with Down syndrome. *Journal of Oral Science* 2001 ; 43 : 207-12.
- 8) Otsuka Y, Ito M, Yamaguchi M, *et al.* Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated cyclooxygenase-2 mRNA expression and Prostaglandin E2 production in gingival fibroblasts from individuals with Down syndrome. *Mechanisms of ageing and development* 2002 ; 123 : 663-74.
 - 9) 田中陽子, 矢口学, 野本たかと. Down 症歯肉線維芽細胞における細胞内シグナル伝達系への Lipopolysaccharide (LPS)の影響. *医学と生物学* 2013 ; 157 : 1107-12.
 - 10) Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997 ; 29 : 5-17.
 - 11) 長谷川麻衣子. 炎症性疼痛-炎症は抑えたほうが良いのか-. *日本ペインクリニック学会誌* 2017 ; 24 : 301-7.
 - 12) Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* 2019 ; 11 : 30.
 - 13) Jenkins K, Javadi M, Borghaei RC. Interleukin-4 Suppresses Interleukin-1-Induced Expression of Matrix Metalloproteinase-3 in Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* 2004 ; 75 : 283-91.
 - 14) 久保允人. インターロイキン 4) IL-4. *臨床免疫・アレルギー科*, 2012 ; 57 : 27-32.
 - 15) Ujiie Y, Karakida T, Yamakoshi Y, *et al.* Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis. *Archives of Oral Biology* 2016 ; 72 : 187-93.
 - 16) Tsai CC, Ku CH, Ho YP, *et al.* Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci* 2007 ; 23 : 1-7.
 - 17) Noguchi K, Shitashige M, Wantabe M, *et al.* Interleukin-4 and Interferon- γ Inhibit Prostaglandin Production by Interleukin-1 β -Stimulated Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Inflammation* 1999 ; 23 : 1-13.
 - 18) Liu T, Zhang L, Joo D, *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Targeted Ther* 2017 ; 2 : 17023.
 - 19) Gupta S, Jain A, Syd SN, *et al.* IL-6 augments IL-4-induced polarization of primary human macrophages through synergy of STAT3, STAT6 and BATF transcription factors. *Oncoimmunology* 2018 ; 30 : e1494110.
 - 20) Thieu VT, Nguyen ET, McCarthy BP, *et al.* IL-4-stimulated NF-kappaB activity is required for Stat6 DNA binding. *J Leukoc Biol* 2007 ; 82 : 370-9.
 - 21) Bennet BL, Cruz R, Lacson RG, *et al.* Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 10212-9.
 - 22) Shen CH, Stavnezer J. Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 3395-404.

- 23) Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, *et al.* IL-4 Modulates CCL11 and CCL20 Productions from IL-1 β -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016 ; 38 : 153-9.
- 24) Saraiva M and O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 170-81.
- 25) Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res* 2008 ; 43 : 712-6.
- 26) Toby Lawrence. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009 ; 1 : a001651.
- 27) 櫻井宏明. 転写因子 NF- κ B の新しい活性機構. *化学と生物* 2004 ; 42 : 35-40.
- 28) Patil C, Zhu X, Rossa CJ, *et al.* p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest* 2004 ; 33 : 213-33.
- 29) Hwang YS, Jeong M, Park JS, *et al.* Interleukin-1 β stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncogene* 2004 ; 23 : 6603-11.
- 30) 小野 崙菊夫. インターロイキン 1 β 細胞増殖制御から慢性炎症性疾患まで. *YAKUGAKU ZASSHI* 2013 ; 133 : 645-60.
- 31) Lin SI, Lin LD, Chang HH, *et al.* IL-1 β induced IL-8 and uPA expression/production of dental pulp cells: Role of TAK1 and MEK/ERK signaling. *J Formos Med Assoc* 2018 ; 117 : 697-704.
- 32) Lee J, Nakagiri T, Oto T, *et al.* IL-6 Amplifier, NF- κ B-Triggered Positive Feedback for IL-6 Signaling, in Grafts Is Involved in Allogeneic Rejection Responses. *J Immunol* 2012 ; 189 : 1928-36.
- 33) 村上正晃. 神経活性化による炎症反応の制御. *心臓* 2015 ; 47 : 261-8.
- 34) Murakami M and Hirano T. A four-step model for the IL-6 amplifier, a regulator of chronic inflammations in tissue-specific MHC class II-associated autoimmune diseases. *Front Immunol* 2011 ; 2 : 22.
- 35) Granese B, Scala I, Spatuzza C, *et al.* Validation of microarray data in human lymphoblasts shows a role of the ubiquitin-proteasome system and NF- κ B in the pathogenesis of Down syndrome. *BMC Med Genomics* 2013 ; 6 : 24.
- 36) Casella G, Garzetti L, Gatta AT, *et al.* IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation* 2016 ; 13 : 139.
- 37) Buckley MG, Williams CM, Thompson J, *et al.* IL-4 enhances IL-3 and IL-8 gene expression in a human leukemic mast cell line. *Immunology* 1995 ; 84 : 410-5.
- 38) Standiford TJ, Strieter RM, Chensue SW, *et al.* IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J Immunol* 1990 ; 145 : 1435-39.
- 39) 出原賢治. ヒト IL-4, IL-13 受容体と気管支喘息. *アレルギー* 2005 ; 54 : 7-11.
- 40) Takeda K, Tanaka T, Shi W, *et al.* Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* ; 380 : 627-30.
- 41) Mitchell RE, Hassan M, Burton BR, *et al.* IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells:

- implications for Th1 and Th2 regulation. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 11315.
- 42) Yasukawa H, Ohishi M, Mori, H. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 551-6.
- 43) Martincuks A, Andryka K, Küster A, *et al.* Nuclear translocation of STAT3 and NF- κ B are independent of each other but NF- κ B supports expression and activation of STAT3. *Cell Signal* 2017 ; 32 : 36-47.
- 44) Akihiko Yoshimura. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 2006 ; 97 : 439-47.
- 45) Joanna OK, Leszek B, Wojciech S, *et al.* Anti-inflammatory plasma cytokines in children and adolescents with Down syndrome. *Folia Histochem Cytobiol* 2010 ; 48 : 667-70.

表タイトル

表 1 プライマー配列

Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-6	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
IL-8	ATTGCATCTGGCAACCCTAG	CTGCGCCAACACAGAAATTA
GAPDH	GTAGAGGCAGGGATGATGT	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA

図説明

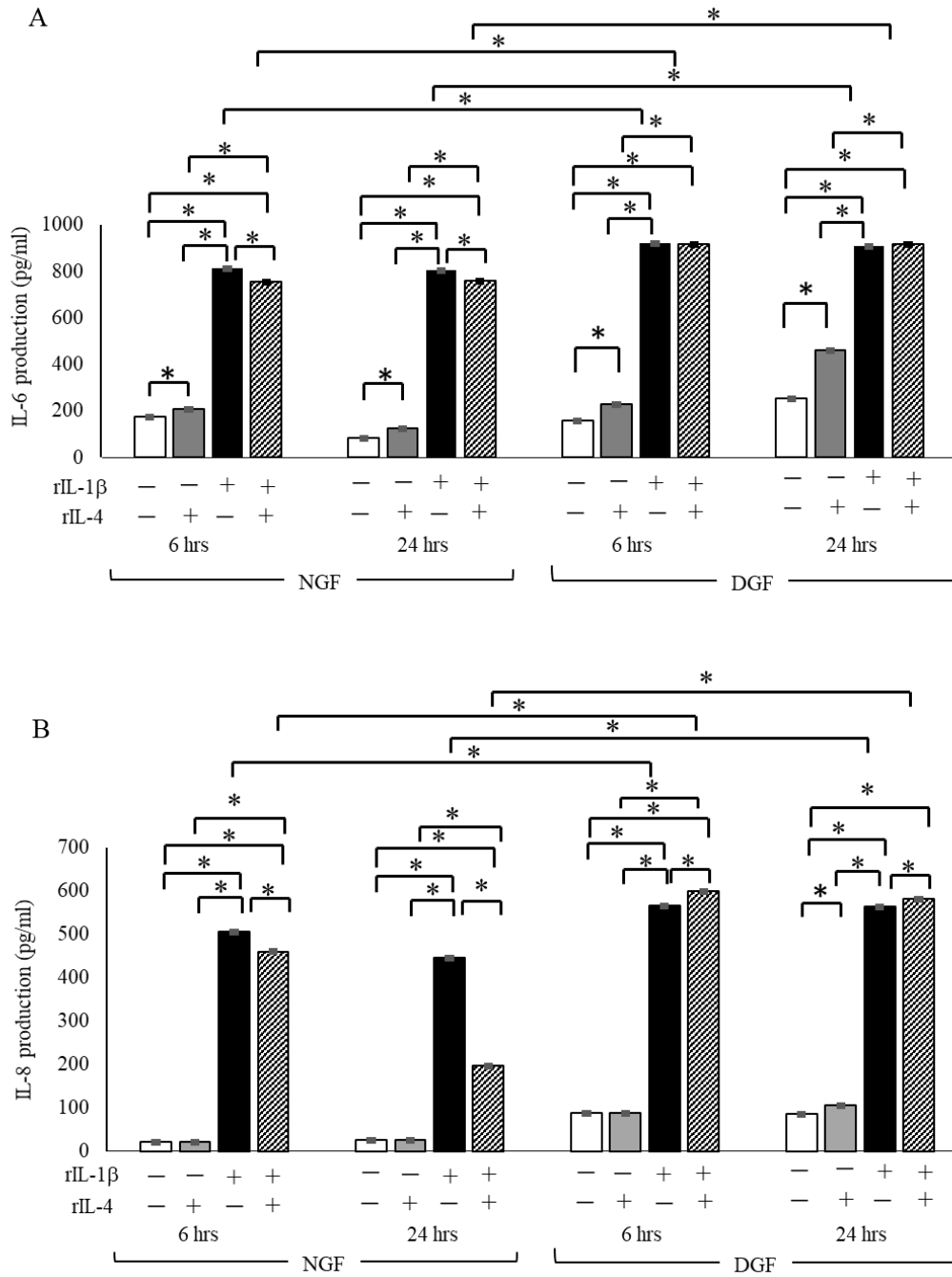
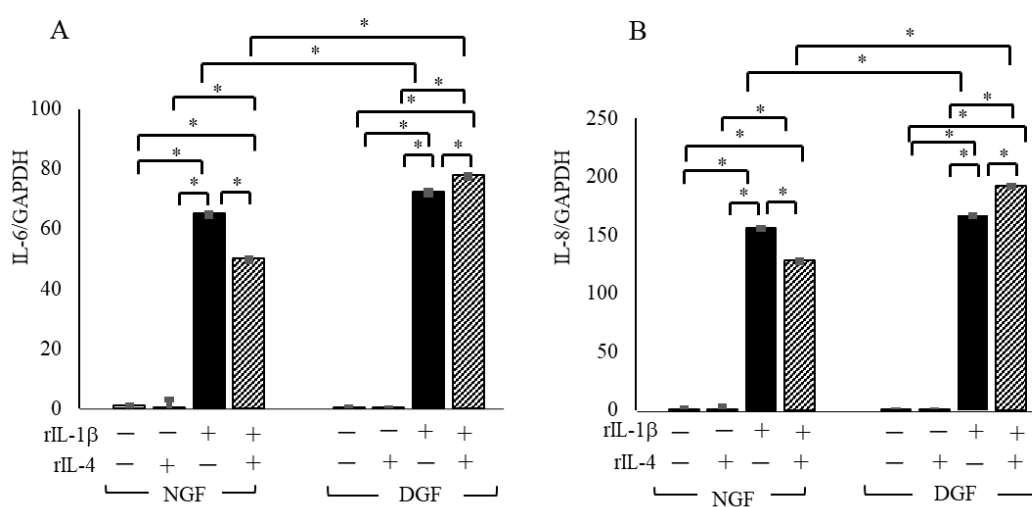


図1 rIL-1βおよびrIL-4のタンパク産生量への影響

A : IL-6 産生量, B : IL-8 産生量 NGF (n=4) および DGF (n=4) とともに各実験群 n=1 あたり 3 dish ずつとした。NGF 群, DGF 群とも 12 サンプル (n 数×3 dish) から得られデータをグラフに示した。実験群は, 白 : コントロール群, グレー : rIL-4 単独添加群 (rIL-4 群), 黒 : rIL-1β単独添加群 (rIL-1β群), 斜線 : rIL-1β, rIL-4 同時添加群 (rIL-1β/IL-4 群) の 4 つである。IL-6 産生量は, NGF, DGF とともにコントロール群に比べて rIL-4 群および rIL-1β群

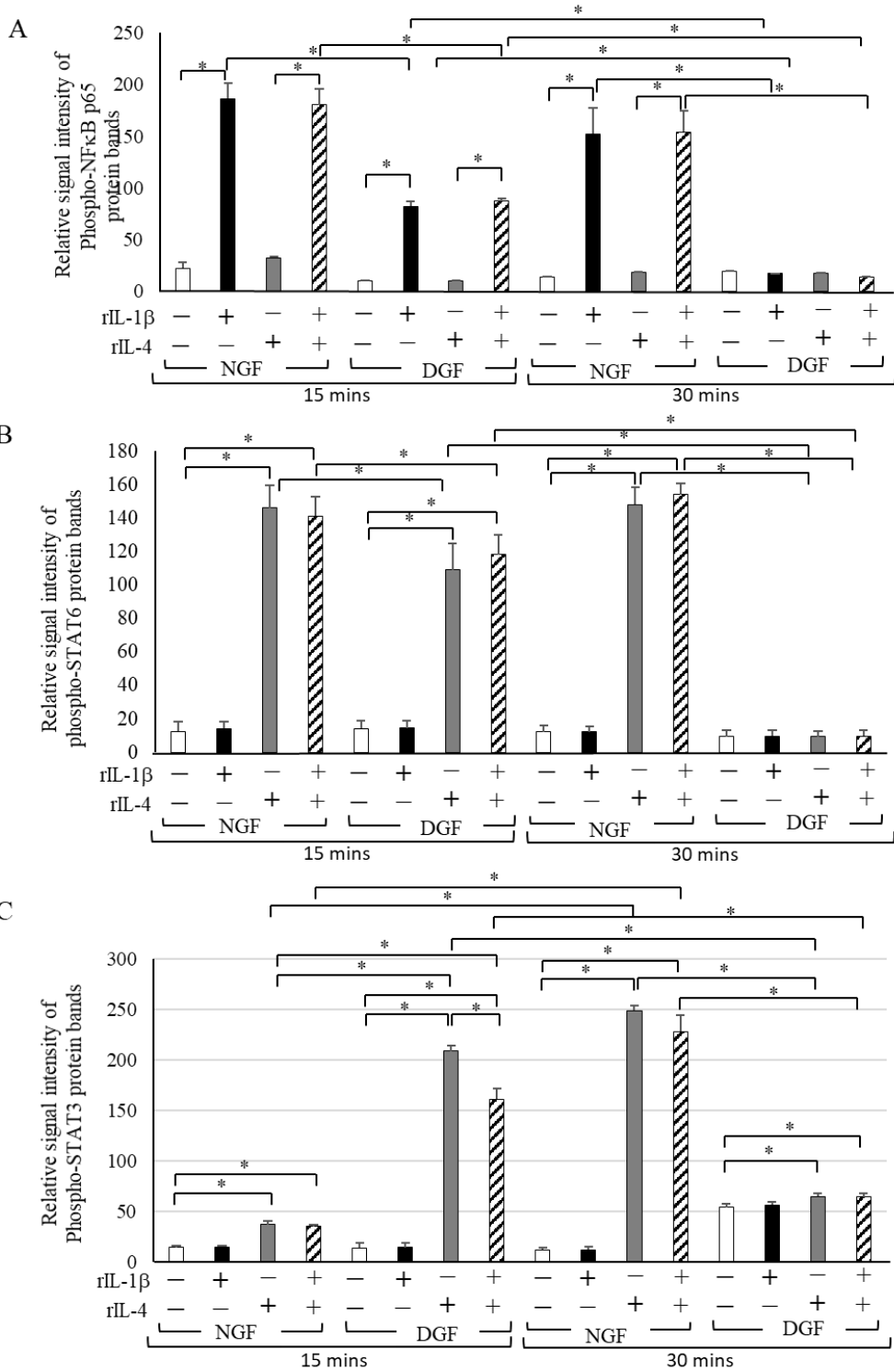
の方が有意に高かった。NGF は rIL-1 β 群に比べて rIL-1 β /IL-4 群は有意に低く、 DGF は rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群に有意差は認めなかった (A)。IL-8 産生量は、 NGF、 DGF ともにコントロール群に比べて rIL-1 β 群の方が有意に高かった。 IL-4 群は DGF の 24 時間のみコントロール群と比べて有意に高かった。 NGF は rIL-1 β 群に比べて rIL-1 β /IL-4 群は有意に低く、 DGF は rIL-1 β 群よりも rIL-1 β /IL-4 群の方が有意に高かった (B)。有意差を認めたものに*を付与した。* : $p < 0.05$

図2 rIL-1 β および rIL-4 の遺伝子発現への影響



A : IL-6 遺伝子発現, B : IL-8 遺伝子発現 NGF (n=4) および DGF (n=4) ともに各実験群 n=1 あたり 3 dish ずつとした。NGF 群, DGF 群とも 12 サンプル (n 数×3 dish) から得られデータをグラフに示した。ターゲット遺伝子の発現量は GAPDH に対する比率で表した。実験群は、白 : コントロール群, グレー : rIL-4 単独添加群 (rIL-4 群), 黒 : rIL-1 β 単独添加群 (rIL-1 β 群), 斜線 : rIL-1 β , rIL-4 同時添加群 (rIL-1 β /IL-4 群) の 4 つである。IL-6, IL-8 遺伝子発現ともに、NGF, DGF でコントロール群に比べて rIL-1 β 群の方が有意に高く、rIL-4 群は有意差を認めなかった。rIL-1 β 群, rIL-1 β /IL-4 群ともに NGF と比べて、DGF の方が有意に高かった。NGF は rIL-1 β 群に比べて rIL-1 β /IL-4 群は有意に低く、DGF は rIL-1 β /IL-4 群の方が有意に高かった(A, B)。有意差を認めたものに*を付与した。* : $p < 0.05$

図3 rIL-1 β および rIL-4 の転写因子への影響



IL-1 β および IL-4 の細胞内シグナル伝達を確認するため、Western blotting 法によって、転写因子のリン酸化を検出した。リン酸化は、phospho- NF- κ B p65, phospho-STAT6および phospho-

STAT3 のバンドの輝度値を内部標準である β -actin の輝度値で標準化した相対シグナル強度によって比較した。

(A) phospho- NF- κ B p65 ; NGF では 15 分, 30 分で rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群で高く両群間に有意差は認めなかった。時間的依存も認められなかった。 DGF では 15 分, 30 分で rIL-1 β 群と rIL-1 β /IL-4 群で高く両群間に有意差は認めず, 30 分の方が有意に低かった。 NGF よりも DGF の方が低かった。(B) phospho-STAT6 ; NGF では 15, 30 分ともに rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群で検出され両群間に有意差は認めず, さらに時間による有意差も認めなかった。 DGF では 15 分, 30 分で rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群で検出されたが, 30 分の方がいずれの群も有意に低かった。 NGF との比較では DGF の方が低かった。(C) phospho-STAT3 ; NGF では 15 分での検出は低く, 30 分で rIL-4 群および rIL-1 β /IL-4 群の相対シグナル強度は高かった。 DGF においては, 15 分, 30 分ともに全ての群に検出が認められたが, 15 分での rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群において相対シグナル強度は高く, rIL-4 の方が有意に高かった。 30 分では, コントロール比べて rIL-4 群と rIL-1 β /IL-4 群の相対シグナル強度は高いものの 15 分に比べて有意に低かった。有意差のあったものに*を付与した。* : $p < 0.05$